

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

## 特開平8-84586

(43) 公開日 平成8年(1996)4月2日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C12N 9/24

C07H 1/00

3/06

21/04

B

C12N 1/21

8828-4B

審査請求 未請求 請求項の数 29 FD (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平7-189706

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

(22) 出願日

平成7年(1995)7月4日

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(31) 優先権主張番号

特願平6-190183

(72) 発明者 丸田 和彦

(32) 優先日

平6(1994)7月21日

(72) 発明者 久保田 倫夫

(33) 優先権主張国

日本 (JP)

(72) 発明者 杉本 利行

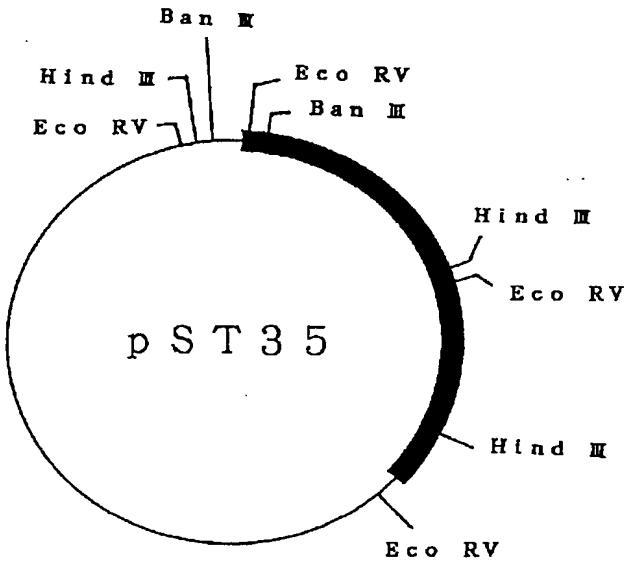
岡山県岡山市東畦695番44号

(54) 【発明の名称】還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素

## (57) 【要約】

【目的】 還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素、その組換え型耐熱性酵素をコードするDNAとそのDNAを含む組換えDNAと形質転換体、その形質転換体を利用する組換え型耐熱性酵素の製造方法、さらには、組換え型耐熱性酵素による還元性澱粉糖の酵素的変換方法を提供する。

【構成】 特定の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素と、その組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと、そのDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAと、その組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法と、特定の還元性澱粉糖に組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法を要旨とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素。

## (1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

## (2) 分子量

S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

## (3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

## (4) 熱安定性

水溶液(pH7.0)中、85°Cで60分間インキュベートしても実質的に失活しない。

【請求項2】 配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列又はそれに相同意的なアミノ酸配列を有する請求項1に記載の組換え型耐熱性酵素。

【請求項3】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNA。

【請求項4】 配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 スルフォロブス属の微生物に由来する請求項3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと、自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBlue script II SK (+)又はpKK223-3である請求項7、8、9又は10に記

載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項13】 DNAが配列表における配列番号2示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項12に記載の形質転換体。

10 【請求項14】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項12又は13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項12、13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBlue script II SK (+)又はpKK223-3である請求項12、13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 宿主が大腸菌である請求項12、13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項19】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項18に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項20】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項18又は19に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項21】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項18、19又は20に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項22】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBlue script II SK (+)又はpKK223-3である請求項18、19、20又は21に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項23】 宿主が大腸菌である請求項18、19、20、21又は22に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項24】 培養物中の組換え型耐熱性酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈殿、イオン交換

クロマトグラフィー、ゲル漉過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項18、19、20、21、22又は23に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項25】 グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖に請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項26】 還元性澱粉糖が澱粉又は澱粉質を酸及び／又はアミラーゼにより加水分解して得られたものである請求項25に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項27】 還元性澱粉糖がマルトトリオース、マルトテトラオース、マルペンタオース、マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオースである請求項25又は26に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項28】 還元性澱粉糖濃度が50% (w/w) 以下の水溶液に組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、55℃を越える温度で作用させる請求項25、26又は27に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項29】 非還元性糖質が $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース又は $\alpha$ -マルペンタオシルトレハロースである請求項25、26、27又は28に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素に関するものである。

##### 【0002】

【従来の技術】 トレハロースは、グルコース2分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付ける利点がある。しかしながら、従来の方法では所望量を入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆どなかった。

【0003】 これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭50-154485号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、主として菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭58-216695号公報などにもみられるように、基

質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォスフオリラーゼとトレハロース・フォスフォリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの増殖は比較的容易なもの、菌体に含まれるトレハロースが高々15% (w/w) と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なもの、反応自体が2種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコース磷酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げるのが原理的に難しかった。

【0004】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾピウム属やアルスロバクター属に属するある種の微生物がグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を产生することを見出し、特願平5-349216号明細書に開示した。そして、この非還元性糖質は、グルコアミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させると、容易にトレハロースを与えることも見出した。

【0005】 ところが、上記微生物が产生する酵素は、いずれも40℃付近に至適温度を有しており、実際にトレハロースの製造に使用するには熱安定性にやや難のあることが判明した。すなわち、斯界においては、澱粉や澱粉質を糖化するには、一般に、55℃を上回る温度で反応させるのが望ましいとされており、これは、55℃以下で糖化すると雑菌汚染が顕著となり、反応物のpHが低下して酵素が失活したり、これにより、大量の基質が未反応のまま残存したりすることによる。敢えて熱安定性に劣る酵素で糖化しようとすると、pHの推移に多大の注意を払わなければならず、万一、pHが顕著に低下した場合には、反応物にアルカリ等を加えて可及的速やかにpHを上昇させるなどの対策を講じなければならない。

【0006】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、斯かる作用ある耐熱性酵素につき引き続き検索したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC33909) を始めとするスルフォロブス属の微生物が产生する酵素は、55℃を上回る温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を効率的に生成することを見出した。しかしながら、これら微生物はいずれも酵素の產生能が充分でなく、トレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を大規模に製造しようすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【0007】 一方、昨今の組換えDNA技術の進歩には目覚ましいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝

子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、上記耐熱性酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】この発明の目的は、組換えDNA技術を応用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素を創製することにある。

【0009】この発明の別の目的は、その創製された組換え型耐熱性酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0010】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAを含む複製可能な組換えDNAを提供することにある。

【0011】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを導入した形質転換体を提供することにある。

【0012】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を利用する、組換え型耐熱性酵素の製造方法を提供することにある。

【0013】この発明のさらに別の目的は、組換え型耐熱性酵素を利用する、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換する方法を提供することにある。

## 【0014】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素により解決するものである。

## (1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

## (2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

## (3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

## (4) 熱安定性

水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても、実質的に失活しない。

【0015】この発明は、前記第二の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAにより解決するものである。

【0016】この発明は、前記第三の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベ

クターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0017】この発明は、前記第四の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0018】この発明は、前記第五の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法により解決するものである。

【0019】この発明は、前記第六の課題を、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖に上記組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法により解決するものである。

## 【0020】

【作用】この発明の組換え型耐熱性酵素は、55℃を越える温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

【0021】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して複製可能な組換えDNAとし、これを、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0022】この発明の組換えDNAは、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0023】この発明の形質転換体は、培養すると、当該酵素を産生する。

【0024】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量の当該酵素が容易に得られる。

【0025】この発明の酵素的変換方法により、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換される。

【0026】この発明は、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する、従来未知の全く新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の培養物から得ることができ、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合わせてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

## (1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

#### (2) 分子量

S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

#### (3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

#### (4) 至適温度

pH 5.5で60分間反応させると、75℃付近に至適温度を示す。

#### (5) 至適pH

60℃で60分間反応させると、pH 5.0乃至5.5に至適pHを示す。

#### (6) 熱安定性

pH 7.0で60分間インキュベートすると、85℃付近まで安定である。

#### (7) pH 安定性

4℃で24時間インキュベートすると、pH 4.0乃至9.5まで安定である。

【0027】次に、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC 33909)が産生する耐熱性酵素の理化学的性質を解明すべく行った実験について説明する。

#### 【0028】

【実験例1 精製酵素の調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 磷酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH 3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC 33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して第一の種培養液を得た。10l容ファーメンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH 3.0に調整後、第一の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養して第二の種培養液を得た。その後、300l容ファーメンターに上記と同一組成の液体培地を約250lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH 3.0に調整後、第二の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量100l/分で42時間通気攪拌培養した。

【0029】約170lの培養物をS F膜により膜濾過し、遠心分離して得られた湿重量約258gの菌体を10mM磷酸緩衝液(pH 7.0) 300mlに浮遊させ、超音波を印加して菌体を破碎した。破碎物を10,000rpmで30分間遠心分離し、得られた約300

mlの上清に硫酸アンモニウムを70%飽和になるように加え、4℃で24時間静置後、10,000rpmで30分間遠心分離した。沈澱部を採取し、適量の10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に溶解し、新鮮な同じ緩衝液に対して24時間透析後、10,000rpmで30分間遠心分離して酵素活性ある約600mlの上清を得た。

【0030】この上清を略二等分し、それぞれ別々に、予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡

10 化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『D E A E - T Y P A R L』約350mlのカラムに負荷し、0Mから0.3Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を通液した。塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に対して10時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用ゲル『ブチルトヨパール650』約350mlのカラムに負荷し、1Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を通液した。

【0031】硫酸アンモニウム濃度0.8M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に対して16時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め0.2M塩化ナ

30 トリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡化させておいたセブラコル製ゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル『ウルトログルA c A 44』約350mlのカラムに通液した。溶出液から酵素活性ある画分を採取し、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に対して16時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡化させておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『M o n o Q』約10mlのカラムに負荷し、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を通液した。

40 そして、塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、以下の実験に供した。このようにして調製した精製酵素の比活性は約81単位/mg蛋白質であり、収量は培養物11当たり約0.24単位であった。

【0032】常法により、この精製酵素を7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動したところ、ゲル上には酵素活性を伴なう実質的に単一のバンドが観察され、精製酵素が極めて高純度であることが窺わ

れた。

【0033】なお、この発明を通じて、耐熱性酵素の活性は、次の方法により測定した活性値(単位)で表示する。すなわち、基質としてマルトペンタオースを1.25% (w/v) 含む20mM酢酸緩衝液(pH 5.5) 4mlに適宜希釈した酵素液を1ml加え、60℃で60分間インキュベートして反応させた後、100℃で30分間加熱して反応を停止させる。反応物を1mlとり、脱イオン水で10倍希釈した後、ソモギーネルソン法により還元力を測定する。同時に、予め100℃で30分間加熱して失活させておいた酵素液を使用する系を設け、上記と同様に処置して対照とする。耐熱性酵素の1単位とは、上記反応条件下において、1分間にマルトペンタオース1μmolに相当する還元力を消失させる酵素量と定義する。

#### 【0034】

#### 【実験例2 耐熱性酵素の理化学的性質】

10

#### 【0035】

【実験例2-1 作用】基質としてグルコース、マルトース、マルトリオース、マルテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース又はマルトヘプタオースを10% (w/v) 含む水溶液を調製し、これに実験例1で調製した精製酵素を基質固形分1g当たり2単位加え、60℃、pH 5.5で48時間反応させた。反応物を常法により脱塩後、和光純薬工業製高速液体クロマトグラフィー用カラム『ワコーピーズWB-T-330』を使用する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により糖組成を分析した。高速液体クロマトグラフィーは室温下で実施し、溶出液を東ソー製示差屈折計『RI-8012型』でモニタしながら、溶離液として水を0.5ml/分の流速で通液した。結果を表1に示す。

#### 【0036】

#### 【表1】

基 質	反応物中の糖質	組成 (%)
グルコース	グルコース	100
マルトース	マルトース	100
マルトリオース	グルコース マルトース マルトリオース $\alpha$ -グルコシルトレハロース	9.2 18.4 42.2 30.2
マルテトラオース	グルコース マルトース マルトリオース マルテトラオース $\alpha$ -グルコシルトレハロース $\alpha$ -マルトシルトレハロース	6.7 2.7 9.0 16.2 8.2 57.2
マルトペンタオース	グルコース マルテトラオース マルトペンタオース $\alpha$ -マルトシルトレハロース $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース	0.7 2.0 22.9 0.9 73.5
マルトヘキサオース	グルコース マルトペンタオース マルトヘキサオース $\alpha$ -マルトトリオシルトレハロース $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース	0.9 2.2 28.1 5.6 68.2
マルトヘプタオース	グルコース マルトヘキサオース マルトヘプタオース $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース	1.0 1.4 23.4 4.2 70.0

【0037】表1の結果は、精製酵素がグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖であるマルトリオース、マルテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースに作用して、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質である $\alpha$ -グルコシル

トレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロースを生成したことを示している。反応物からはこれら非還元性糖質と未反応の基質に加えて、基質の加水分解物と考

えられるグルコース及び低分子のマルトオリゴ糖が検出され、精製酵素に加水分解作用のあることを示唆している。個々の基質からの非還元性糖質及び加水分解物の収量は、固体分当たり、マルトトリオースでそれぞれ30.2%及び27.6%で、マルトテトラオースで65.4%及び18.4%、マルトペンタオース乃至マルトヘptaオースで約74乃至75%及び約2乃至3%であり、グルコース重合度5以上のマルトオリゴ糖からは非還元性糖質が好収率で生成し、加水分解も僅少となる傾向が見られた。なお、グルコース及びマルトースからは新たな糖質の生成を見なかった。

## 【0038】

【実験例2-2 分子量】ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じて精製酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量約69,000乃至79,000ダルトンに相当する位置に酵素活性を伴う単一バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ミオシン(200,000ダルトン)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(116,250ダルトン)、フォスフォリラーゼB(97,400ダルトン)、血清アルブミン(66,200ダルトン)及びオボアルブミン(45,000ダルトン)であった。

## 【0039】

【実験例2-3 等電点】2% (w/v) アンフォラインを含むポリアクリルアミドゲル上で精製酵素を等電点電気泳動したところ、約5.4乃至6.4に等電点を示した。

## 【0040】

【実験例2-4 至適温度】常法により、20 mM酢酸緩衝液(pH 5.5)中、相違する温度で60分間反応させたところ、図1に示すように、精製酵素は75°C付近に至適温度を示した。

## 【0041】

【実験例2-5 至適pH】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液中、60°Cで60分間反応させたところ、図2に示すように、精製酵素はpH 5.0乃至5.5付近に至適pHを示した。

## 【0042】

【実験例2-6 熱安定性】常法により、10 mM磷酸緩衝液(pH 7.0)中、相違する温度で60分間インキュベートしたところ、図3に示すように、精製酵素は85°C付近まで安定であった。

## 【0043】

【実験例2-7 pH安定性】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液又は50 mM炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、25°Cで16時間インキュベートしたところ、図4に示すように、精製酵素はpH 4.5乃至9.5付近まで安定であった。

## 【0044】

【実験例2-8 N末端アミノ酸配列】常法により、パーキン・エルマー製気相プロテイン・シーケンサ『473 A型』を使用して分析したところ、精製酵素はN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有していた。

## 【0045】

【実験例2-9 部分アミノ酸配列】精製酵素を適量とり、10 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)に対して4°Cで18時間透析後、10 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)を加えて酵素濃度約1 mg/mlとした。この溶液を約1 mlとり、リジルエンドペプチダーゼを10  $\mu$ g加え、30°C、48時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を予め16% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた日本ミリボア・リミテッド製高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロポンダーパックC18』に負荷し、16% (v/v) から48% (v/v) に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.9 ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約11分後に溶出したペプチド断片を含む画分を採取し、真空乾燥後、50% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例2-8と同様に分析したところ、ペプチド断片は配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列を有していた。

【0046】以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。

## 【0047】そこで、本発明者が、配列表における配列

番号3及び4に示す部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の染色体DNAを鋭意検索したところ、配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列を有する約2,200塩基対からなるDNA断片が得られた。そして、その塩基配列を解読したところ、同微生物が产生する耐熱性酵素は720個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0048】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

(1) 供与体微生物の培養物から耐熱性酵素を分離し、高度に精製後、N末端アミノ酸配列を決定した。一方、その精製酵素プロテアーゼにより部分加水分解し、加水分解物からペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(2) 別途、供与体微生物の菌体より染色体DNAを分離し、精製後、制限酵素により部分消化し、消化物から約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断

片を採取した。DNAリガーゼにより、このDNA断片を予め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えDNAを作製した。

(3) 大腸菌にこの組換えDNAを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより当該酵素をコードするDNAを含む形質転換体を選択した。

(4) 形質転換体から組換えDNAを採取し、プライマーとともにアニーリング後、DNAポリメラーゼを作用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖DNAをジオキシ・チーン・ターミネータ法により分析して塩基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。

【0049】次の実験例3及び4では、上記(2)乃至(4)の工程を具体的に説明するが、これら実験例で使用する手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サムブルック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ一発行などにも詳述されている。

#### 【0050】

【実験例3 耐熱性酵素をコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

#### 【0051】

【実験例3-1 染色体DNAの調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 磷酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレープして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。10l容ファーメンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気搅拌培養した。

【0052】遠心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液(pH8.0)に浮遊させ、リゾチームを0.05% (w/v) 加え、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、冰冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈澱した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液

(pH7.1)に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ7.5μg又は125μg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈澱を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

#### 10 【0053】

【実験例3-2 組換えDNA pST35と形質転換体ST35の調製】実験例3-1で調製した精製染色体DNA溶液を1mlとり、これに制限酵素Sau3A Iを約35単位加え、37℃で20分間反応させて染色体DNAを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、ストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『Blue script II SK (+)』を1μgとり、常法により制限酵素Bam HIを作用させて完全に切断した後、上記で得たDNA断片10μgとT4 DNAリガーゼを2単位加え、4℃で一夜静置することによりDNA断片に連結した。得られた組換えDNAにストラタジーン・クローニング・システムズ製コンピテントセル『Epicurian Coli XL1-Blue』を30μl加え、冰冷下で30分間静置後、42℃に加温し、SOCプロスを加え、37℃で1時間インキュベートして組換えDNAを大腸菌に導入した。

【0054】このようにして得た形質転換体を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを50μg/ml含む寒天平板培地(pH7.0)に接種し、37℃で18時間培養後、培地上に形成された約5,000個のコロニーをナイロン膜上に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列のAsn-Leu-Trp-Tyr-Phe-Lys-Aspで表わされる配列に基づき5'-AACTYNTGGTAYTTYAARGA-3'で表わされる塩基配列のプローブ1を化学合成し、同位体<sup>32</sup>Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した15種類の形質転換体を選択した。

【0055】常法により、これら15種類の形質転換体から組換えDNAを採取する一方、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列のGlu-Glu-Trp-His-Ser-Ile-Ileで表わされる配列に基づき5'-GARGARTGGCAYWASNATHAT-3'で表わされる塩基配列のプローブ2を化学合成し、同位体<sup>32</sup>Pで標識後、イー・エム・ザザーン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第98巻、第503乃至517頁(1975年)に記載されて

いる方法に準じて上記組換えDNAにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えDNAを採取した。このようにして得た組換えDNA及び形質転換体を、それぞれ、『pST35』、『ST35』と命名した。

【0056】形質転換体ST35をアンピシリン100μg/m1を含むL-プロス培地(pH7.0)に接種し、37℃で24時間回転振盪培養し、培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ法により組換えDNAを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えDNA pS T35は約6,200塩基対からなり、図5に示すように、当該酵素をコードする約2,200塩基対からなるDNAを制限酵素Eco RVによる切断部位の下流に連結していた。

## 【0057】

【実験例3-3 形質転換体ST35による組換え型耐熱性酵素の产生】500m1容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 磷酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地(pH7.0)を約100m1ずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを50μg/m1加えた。この液体培地に実験例3-2で調製した形質転換体ST35を接種し、37℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、101容ファーメンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、37℃まで冷却後、アンピシリンを50μg/m1加え、種培養液を1% (v/v) 接種し、37℃、通気量500m1/分で24時間通気攪拌培養した。

【0058】培養物を常法により超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去し、上清に硫酸アンモニウムを70%飽和になるように加え、4℃で24時間静置後、遠心分離により沈殿部を採取した。この沈殿を少量の10mM磷酸緩衝液(pH8.5)に溶解し、新鮮な同一緩衝液に対して10時間透析後、酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり約8.0単位の組換え型耐熱性酵素が検出された。

【0059】対照として、大腸菌XL1-BLUE株又はスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)をアンピシリン無含有の上記と同一組成の液体培地を使用し、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の場合、始発pH及び培養温度をそれぞれ3.0及び75℃に設定した以外は前記と同様に培養・処理した。処理物の酵素活性を測定したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)により耐熱性酵素の產生は培養物1l当たり約1.8単位と、形質転換体ST35と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XL1

-BLUE株は耐熱性酵素を全く産生しなかった。

【0060】その後、形質転換体ST35が産生した組換え型耐熱性酵素を実験例1乃至2の方法により精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約69,000乃至79,000ダルトンと等電点電気泳動で約5.4乃至6.4に等電点を示すとともに、水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。このことは、組換えDNA技術によっても耐熱性酵素を製造でき、且つ、その生産性も有意に向上することを示唆している。

## 【0061】

【実験例4 相補鎖DNAの調製並びにその塩基配列及びアミノ酸配列の決定】実験例3-2で調製した組換えDNA pST35を2μgとり、これに2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートDNAを含む沈殿を採取し、真空乾燥した。このテンプレートDNAに化学合成した5'-GTAAACGACGGCAGT-3'で表わされる塩基配列のプライマーを50pmol/m1と、20mM塩化マグネシウムと塩化ナトリウムを含む40mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を10μl加え、65℃で2分間インキュベートしてアニーリングした後、dATP、dTTP及びdTTPをそれぞれ7.5μM含む水溶液を2μlと、[α-32P] dCTP(2mCi/m1)を0.5μlと、0.1Mジチオスレイトールを1μlと、1.5単位/m1のT7

DNAポリメラーゼを2μl加え、25℃で5分間インキュベートすることによりプライマーを5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。

【0062】次に、上記で得た相補鎖DNAを含む反応物を四等分し、それぞれにddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTPのいずれかを8μMと80μM dNTPを含む50mM塩化ナトリウム水溶液を2.5μl加え、37℃で5分間インキュベートして反応させた後、20mM EDTA、0.05% (w/v) ブロムフェノールブルー及び0.05% (w/v) キシレンシアノールを含む98% (v/v) 水性ホルムアミド溶液を4μl加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水中で3分間加熱後、6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上にとり、約2,000Vの定電圧を印加しながら電気泳動してDNA断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィーした。

【0063】ラジオグラム上に分離したDNA断片を分析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号5

に示す約 2, 200 塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号 5 に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号 3 及び 4 に示す部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号 3 の配列は配列番号 5 における第 1 乃至 30 番目の配列に、また、配列番号 4 の配列は配列番号 5 における第 468 乃至 478 番目の配列に一致した。これは、この発明の組換え型耐熱性酵素が配列表における配列番号 1 に示す N 末端からのアミノ酸配列を有することあり、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) 由來のDNAにおいては、そのアミノ酸配列が配列表における配列番号 2 に示す 5' 末端からの塩基配列によりコードされていることを示している。

【0064】以上説明したように、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する耐熱性酵素は、本発明者の長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換えDNA技術を応用することにより、この耐熱性酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型耐熱性酵素並びにその製造方法及び用途につき、具体的に説明する。

【0065】この発明でいう組換え型耐熱性酵素とは、組換えDNA技術により創製され、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する耐熱性酵素全般を意味する。この発明の組換え型耐熱性酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号 1 に示す N 末端からのアミノ酸配列又はそれに相同意のアミノ酸配列が挙げられる。配列番号 1 に示すアミノ酸配列に相同意のアミノ酸配列を有する変異体は、所期の理化学的性質を実質的に変えることなく、配列番号 1 のアミノ酸配列における構成アミノ酸の 1 個又は 2 個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成や培養温度・pH などに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の理化学的性質は保持しているものの、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における N 末端付近のアミノ酸が 1 個又は 2 個以上欠失したり、N 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の產生することがある。斯かる変異体であっても、それが所期の理化学的性質を具備しているかぎり、当然、この発明の組換え型耐熱性酵素に包含される。

【0066】この発明による組換え型耐熱性酵素は、特定のDNAを含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、

10

配列表における配列番号 2 に示す 5' 末端からの塩基配列若しくはそれに相同意の塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の 1 個又は 2 個以上を他の塩基に置き換えてよい。また、DNAが宿主中で実際に当該酵素の產生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の 1 個又は 2 個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは言うまでもない。

10

【0067】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) を含むスルフォロブス属の微生物が挙げられる。これら微生物の菌体からはこの発明のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に接種し、好気的条件下で約 1 日乃至 3 日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームやβ-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該DNAを含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、SDSなどの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くて得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈殿、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的のDNAが得られる。

20

一方、DNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号 2 に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

30

【0068】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Bluescript

40

II SK (+)、pKK223-3、pUB11-0、pTZ4、pC194、pHV14、TRP7、YEpl7、pBS7などのプラスミドベクターやλgt・λC、λgt・λB、ρ11、φ1、φ105などのファージベクターが挙げられる。このうち、この発明のDNAを大腸菌で発現させるにはpBR322、pUC18、Bluescript II SK (+)、pKK223-3、λgt・λC及びλgt・λBが好適であ

り、一方、枯草菌で発現させるには pUB110、pTZ4、pC194、p11、 $\phi$ 1及び $\phi$ 105が好適である。pHV14、TRP7、YEP7及びpBS7は、組換えDNAを二種以上の宿主内で複製させる場合に有用である。

【0069】DNAを斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、DNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I型の制限酵素、詳細には、Sau 3AI、EcoRI、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst I、Bam III、Spe Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0070】このようにして得られる組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を含む栄養培地で培養し、該澱粉糖より末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するものを選択すればよい。

【0071】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、トレハロースなどの糖源が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンスティーブリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度20乃至65℃、pH2乃至9に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約1乃至6日間培養すれば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精

製には酵素を精製するための通常の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合させて適用すればよい。

【0072】前述のとおり、この発明による組換え型耐熱性酵素は、55℃を越える温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来の酵素には見られない独特的の性質を有する。生成した非還元性糖質は温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。当該酵素のこの性質を利用することにより、従来、還元性故に敬遠されがちであった種々の澱粉糖を、還元性を有しないか還元性が顕著に低下した、扱い易い、有用な糖質に変換できることとなる。

【0073】斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型耐熱性酵素の基質には、通常、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉又は澱粉質を酸及び／又はアミラーゼによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉糖が用いられる。斯かる澱粉糖は斯界における通常一般の方法により得ることができ、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度3以上のマルトオリゴ糖の1種又は2種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミレーシーズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、1988年、バーガモン・プレス発行に記載されている $\alpha$ -アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、この発明で使用する還元性澱粉糖の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易に且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、ブルナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、当該酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。

【0074】この発明による酵素的変換方法においては、通常、基質として上記したような還元性澱粉糖の1種又は2種以上を含む水溶液にこの発明による組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、pHに保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。反応は0.1% (w/w) 程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の2% (w/w) 以上、望まし

くは、5乃至50% (w/w) とするのがよい。反応時の温度とpHは組換え型耐熱性酵素が失活することなく基質に効率的に作用するレベルに設定され、温度は55°Cを越え、85°Cを越えないレベルに、望ましくは、約56乃至70°Cに、また、pHは4乃至7、望ましくは、約5乃至6の範囲に設定される。組換え型耐熱性酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯くて、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換され、マルトペンタオースの場合、変換率は約74%にも達する。

【0075】この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能ではあるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過、遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的に非還元性糖質のみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどによる分別沈殿、膜濾過、酵母による発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの1種又は2種以上を適用する。大量に反応物を処理するには、例えば、特開昭58-23799号公報や特開昭58-72598号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は疑似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときには、非還元性糖質の含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【0076】斯くて得られる非還元性糖質は、糖質甘味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤などとして極めて有用である。加えて、斯かる非還元性糖質は、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、あるいは、特願平6-79291号明細書に開示されているトレハロース遊離酵素を作用させると、ほぼ定量的にトレハロースを与えることから、従来、大量に入手が難しかったトレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0077】以下、2~3の実施例により、この発明による組換え型耐熱性酵素の製造方法とその組換え型耐熱性酵素による還元性澱粉糖の酵素的変換方法を具体的に説明する。

#### 【0078】

【実施例A-1 組換え型耐熱性酵素の製造】500mL容フラスコに1% (w/v) ポリペプトン、0.5% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を約100mL

mLずつとり、120°Cで20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを50μg/mL加えた。この液体培地に実験例3-2の方法で得た形質転換体ST35を接種し、37°C、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、301容フアーメンターに上記と同一組成の液体培地を約181とし、同様に滅菌し、37°Cまで冷却後、アンピシリンを50μg/mL加え、種培養液を1% (v/v) 接種し、37°Cで24時間通気攪拌培養した。

10 【0079】培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物11当たり、約75単位の組換え型耐熱性酵素が产生していた。この上清を実験例1の方法により精製したところ、比活性約80単位/mg蛋白質の組換え型耐熱性酵素を1mL当たり約57単位含む水溶液が約10mL得られた。

#### 【0080】

【実施例A-2 組換え型耐熱性酵素の製造】

#### 【0081】

20 【実施例A-2 (a) 形質転換体の作製】常法により化学合成した5'-GATCCGTTCTGGCAAA TATTCTGAAATGAGCTGT-3'、5'-TGACAATTAATCATCGGCTCGTCTA ATGTGTGGAATTCTGATTGAA-3'、5'-ATTTTTAATAAAATCAGGAGG AAAAAATATGATATCAGCAACCTAC A-3'、5'-GATTACAGTTAAATAAG AATTTAATTGGTGACGTAATCG ATGAA-3'、5'-TTCACTAGTTAGA ATGTGATGAAGGCCTGGGCCGCTG CAGAGCTCA-3'、5'-CGATGATTA ATTGTCAACAGCTCATTCAGAATA TTTGCCAGAACG-3'、5'-TTTAT TAAAAAATTGAATCAGAATTCCAC ACATTAGACGAGC-3'、5'-TTAAC TGTAACTGTAGGTTGCTGATATCA TATTTTTCTCCTCTGA-3'、5'-TAGAATTCTACGATTACGTCACCAA AATTAAAATTCTTAT-3' 及び5'-AG

40 CTTGAGCTCTGCAGCGGCCGAGGC CTTCATCACATTCTAAC-3' で表わされる塩基配列を有する10種類のオリゴヌクレオチドを適量混合し、100°C、65°C、37°C及び20°Cでそれぞれ20分間インキュベートしてアニールさせた。得られた下記の化1に示す塩基配列の二本鎖DNAに予め制限酵素BamHI及びHindIIIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』を加え、T4DNAリガーゼの存在下、4°Cで一晩静置して連結させることにより、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第1乃至59番目及び第2、

149乃至2, 160番目の塩基配列を含む第一の組換えDNAを得た。なお、この第一の組換えDNAにおいては、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第一

5' - GATCCGTTCT GGCAAATATT CTGAAATGAG CTGTTGACAA TTAATCATCG GCTCGTCAA	60	
3' - GCAAGA CGCTTATAA GACTTACTC GACAAGTGT AATTAGTAGC CGAGCAGATT	56	
TGTTGGAAT TCTGATTCGA ATTTTTAAT AAAATCAGGA GGAAAAAAAATA TGATATCAGC	120	
ACACACCTTA AGACTAACGT TAAAAAAATT TTTTACTCCT CCTTTTTTAT ACTATAGTCG	118	
AACCTACAGA TTACAGTTAA ATAAGAATT TAATTTGGT GACGTAATCG ATGAATTCAC	180	
TTGGATGTCT AATGTCATT TATTCTTAAA ATTAAAACCA CTGCATTAGC TACTTAAGTG	176	
TAGTTAGAAT GTGATGAAGG CCTGCGGCCG CTGCAGAGCT CA	-3'	222
ATCAATCTTA CACTACTTCC GGACGCCGGC GACGTCTCGA GTTCGA-5'		222

【0083】別途、実験例3-2の方法により得た組換えDNA pST35を制限酵素Bam I II及びSpe Iで切断し、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第60乃至2, 148番目までの配列を含む約2, 090塩基対のDNA断片を得た。このDNA断片に予め制限酵素Bam I II及びSpe Iで切断しておいた第一の組換えDNAを上記と同様にして連結することにより、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく配列番号2に示す塩基配列における第一番目のグアニンのみがアデニンに置換された2, 160塩基対の塩基配列を含むこの発明による組換えDNA pST36を得た。

【0084】この組換えDNA pST36を実験例3-2の方法に準じて宝酒造製コンピテントセル『BMH71-18』に導入し、この発明による組換え型耐熱性酵素をコードするDNAを含む形質転換体ST36を得た。実験例3-2の方法により形質転換体ST36を培養し、培養物から菌体を採取し、溶出させた組換えDNAを精製し、分析したところ、組換えDNA pST36は約6, 700塩基対からなり、図6に示すように、当該酵素をコードする約2, 160塩基対からなるDNAを制限酵素Eco RVによる切断部位の下流に連結していた。

#### 【0085】

【実施例A-2 (b) 形質転換体による組換え型耐熱性酵素の製造】形質転換体ST36を2% (w/v) マルトース、4% (w/v) 『N-Z-Soyペプトン』(シグマ製)、2% (w/v) 酵母エキス、0. 5% (w/v) 磷酸二水素ナトリウム、200 μg/m1アンピシリン及び水からなる液体培地 (pH 7. 0) を用いた以外は実施例A-1と同様にして培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物11当たり、約120, 000単位の組換え型耐熱性酵素が產生していた。この上清を実験例1の方法により精製したところ、比活性約80単位/mg蛋白質の組換え

番目のグアニンがアデニンに置換されていた。

#### 【0082】

#### 【化1】

型耐熱性酵素を1ml当たり約230単位含む水溶液が約4, 040ml得られた。

#### 【0086】実験例2の方法によりこの精製酵素の性質

・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約69, 000乃至79, 000ダルトンと等電点電気泳動で約5. 4乃至6. 4に等電点を示すとともに、水溶液 (pH 7. 0) 中、85°Cで60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) が产生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。

#### 【0087】

【実施例B-1 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】濃度6% (w/w) の馬鈴薯澱粉乳を加熱して糊化した後、pH 4. 5、温度50°Cに調整し、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分1g当たり2, 500単位加え、20時間反応させた。反応物をpH 6. 5に調整し、120°Cで10分間オートクレーブして酵素を失活させた後、40°Cまで冷却し、ノボ・ノルディスク・インダストリー製α-アミラーゼ剤『タマミール60L』を澱粉固形分1g当たり150単位加え、20時間反応させた。新たに得られた反応物を120°Cで20分間オートクレーブして酵素を失活させた後、60°Cまで冷却し、pH 5. 5に調整後、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉固形分1g当たり1単位加え、96時間反応させた。反応物を97°Cで30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を原料澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

【0088】DEが24. 5と低く、非還元性糖質としてα-グルコシルトレハロース、α-マルトシリトレハロース、α-マルトトリオシリトレハロース、α-マルトテトラオシリトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ12. 1%，

5. 4%、30. 0%、1. 4%又は2. 0%含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

## 【0089】

【実施例B-2 非還元性糖質を含む粉状物への変換】  
実施例B-1 の方法で得たシロップ状物における非還元性糖質の含量を高めるべく、強酸性カチオン交換樹脂によるカラム分画を適用した。すなわち、架橋度4%の東京有機化学工業製ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を水中に懸濁させ、内径5. 4 cm、長さ5 mのジャケット付ステンレス製円筒管4本に均一に充填後、円筒管を直列に連結してカラムの全長を20 mとした。カラム温度を55℃に保ちつつ、水で適宜希釈したシロップ状物をカラムに対して約5% (v/v) 負荷し、カラムに55℃の温水をSV0. 13で通液した。そして、溶出液から非還元性糖質の含量が高い画分を採取し、常法により精製し、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、非還元性糖質含量の高い粉状物を原料固形分当たり約64%の収率を得た。

【0090】DEが4. 8と低く、非還元性糖質として $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び $\alpha$ -マルペンタオシルトレハロースを固形分当たり12. 8%、11. 5%、46. 6%、2. 3%又は3. 4%含む本品は、実施例B-1のシロップ状物と同様、温和で上品な甘味を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

## 【0091】

【実施例B-3 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】濃度33% (w/w) のとうもろこし澱粉乳に最終濃度0. 1% (w/w) となるように炭酸カルシウムを加え、pH 6. 5に調整後、ターマミール60 Lを澱粉固形分当たり0. 2% (w/w) 加え、95℃で15分間反応させた。反応物を120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、55℃に冷却後、林原生物化学研究所製シードモナス・スツッメリ由来のマルテオラオース生成アミラーゼ剤を澱粉固形分1 g当たり5単位加えて6時間反応させた。反応物に上田化学製 $\alpha$ -アミラーゼ剤『 $\alpha$ -アミラーゼ2A』を澱粉固形分1 g当たり30単位加え、65℃でさらに4時間反応させた後、120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、65℃まで冷却し、pH 5. 5に調整し、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉固形分1 g当たり2単位加え、48時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で

脱塩・精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を原料澱粉固形分当たり約90%の収率を得た。

【0092】DEが17. 1と低く、非還元性糖質として $\alpha$ -グルコシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース及び $\alpha$ -マルペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ8. 9%、29. 3%、0. 8%、0. 7%又は0. 7%含む本品

10 は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

## 【0093】

【実施例B-4 非還元性糖質を含む粉状物への変換】林原生物化学研究所製高純度マルテンタオースの20% (w/w) 水溶液に実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素をマルテンタオース1 g当たり1. 0単位加え、70℃で48時間反応させた。マルテンタオースの約72%が $\alpha$ -マルトリオシルトレハロースに変換された反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮した。

【0094】その後、濃縮物に実施例B-2のカラム分画を適用し、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース含量の高い画分を採取し、常法により精製し、濃縮し、噴霧乾燥して非還元性糖質含量の高い粉状物を原料固形分当たり約26%の収率を得た。

【0095】DEが0. 2未満と極めて低く、非還元性糖質として $\alpha$ -マルトリオシルトレハロースを固形分当たり99. 0%含む低甘味の本品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

## 【0096】

【実施例B-5 結晶性トレハロースを含む粉状物への変換】松谷化学工業製還元性澱粉糖『パインデックス#4』40重量部を水60重量部に加熱溶解し、溶液を65℃、pH 5. 5に調整後、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉糖固形分1 g当たり1単位加え、96時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、濃度約20% (w/w) まで希釈後、ナガセ生化学工業グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉糖固形分1 g当たり10単位加えて40時間反応させた。その後、反応物を加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃度約60% (w/w) まで濃縮した。このようにして得られた固形分当たりトレハロースを30. 1% (w/w) 含む濃縮物を分画用イオン交換樹脂としてオルガノ製ナトリウム型強酸

性カチオン交換樹脂『CG6000』を使用した以外は実施例B-2と同様にしてカラム分画することにより、固体分当たりトレハロースを約97% (w/w) 含む画分を採取した。

【0097】この画分を約75% (w/w) まで濃縮し、助晶缶にとり、搅拌しながら徐冷して得た晶出率約45%のマスケットを、約85℃の温風を噴霧乾燥塔上部から下方に向かって送風しつつ、噴霧乾燥塔の上部に設けたノズルより約150kg/cm<sup>2</sup> 加圧下で噴霧乾燥塔の下方に向かって噴霧する一方、噴霧乾燥塔底部に設けた金網コンペア上に捕集した結晶性粉末を、コンペア下部より約45℃の温風を送風しつつ、噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、結晶性粉末を熟成塔に充填し、温風気流中で10時間熟成し、結晶化と乾燥を完了した。このようにして、トレハロース含水結晶の粉状物を原料固体分当たり約90%の收率で得た。

【0098】実質的に吸湿性を示さず、取扱いも容易な本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0099】

【実施例B-6 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】林原生物化学研究所製高純度マルトテトラオースを40% (w/w) 水溶液とし、実施例A-2の方法により得た組換え型耐熱性酵素をマルトテトラオース固体分1g当たり2.0単位加え、60℃で72時間反応させて固体分当たりα-マルトシリルトレハロース及びα-グルコシリルトレハロースをそれぞれ約57%及び約9%含む反応物を得た。この反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、常法にしたがって濾過し、活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製した後、濃縮した。

【0100】その後、濃縮物に実施例B-2のカラム分画を適用し、得られたα-マルトシリルトレハロース含量の高い画分を採取し、常法にしたがって精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を原料マルトテトラオース固体分当たり約90%の收率で得た。

#### 配列

Met	Ile	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Asn	Phe	Gly
1									10						15	
Asp	Val	Ile	Asp	Asn	Leu	Trp	Tyr	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Ser	His	Leu
																20
																25
Tyr	Leu	Ser	Pro	Val	Leu	Met	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Asn	His	Gly	Tyr	Asp
																30
Val	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Ile	Asn	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Glu	Tyr
																35
																40
Arg	Arg	Leu	Ile	Glu	Thr	Ala	His	Thr	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	Ile	Gln	Asp
																45
Ile	Val	Pro	Asn	His	Met	Ala	Val	Asn	Ser	Leu	Asn	Trp	Arg	Leu	Met	Asp
																50
																55
																60
																65
																70
																75
																80
																85
																90
																95
																100

【0101】DEが3.7と低く、非還元性糖質としてα-マルトシリルトレハロース及びα-グルコシリルトレハロースを固体分当たりそれぞれ8.4%及び4.0%含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有しており、甘味材、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

#### 【0102】

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、グル

10 コース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換えDNA技術により、この耐熱性酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明の組換え型耐熱性酵素を使用する変換方法によるときには、雑菌汚染を懸念することなく、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に効率的に変換することができる。この発明の酵素的変換方法により得られる非還元性糖質は温和で上品な甘味を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる実益がある。しかも、この発明の組換え型耐熱性酵素はアミノ酸配列まで明らかにされた酵素であり、飲食物や医薬品への配合使用を前提とするトレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質の製造に安心して使用し得るものである。

【0103】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な30 発明であると言える。

#### 【0104】

#### 【配列表】

配列番号：1  
配列の長さ：720  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

29

30

Val Leu Lys Met Gly Lys Lys Ser Lys Tyr Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe			
105	110	115	
Pro Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu Pro Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr			
120	125	130	135
Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu Lys Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr Phe			
140	145	150	
Leu Glu Tyr Phe Lys Trp Lys Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn Asp Ile			
155	160	165	170
Tyr Asp Thr Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp Lys Asn Pro			
175	180	185	
Pro Ser Tyr Arg Arg Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile Gly Val Asn Val			
190	195	200	
Glu Lys Asp His Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys Ile Leu Asp Leu Asp			
205	210	215	220
Val Asp Gly Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Lys			
225	230	235	
Tyr Ile Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu			
240	245	250	255
Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Leu Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr Thr			
260	265	270	
Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn Gln Glu			
275	280	285	
Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile Ser Ile Ser			
290	295	300	305
Glu Ser Ile Lys Lys Ile Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu Leu Phe Ser Tyr			
310	315	320	
Glu Val Lys Arg Leu Ala Ser Gln Leu Gly Ile Ser Tyr Asp Ile Leu Arg			
325	330	335	340
Asp Tyr Leu Ser Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Val			
345	350	355	
Lys Glu Cys Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Arg Asn Pro			
360	365	370	
Glu Ala Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala			
375	380	385	390
Tyr Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu			
395	400	405	
Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr Tyr Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val			
410	415	420	425
Phe Asn Gln Lys Arg Arg Gly Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr His			
430	435	440	
Asp Thr Lys Phe Ser Glu Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val Leu Ser Glu			
445	450	455	
Phe Pro Glu Glu Trp Lys Asn Lys Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn			
460	465	470	475
Pro Lys Val Ser Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr Gln Val Leu Val Gly			
480	485	490	
Ser Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys Glu Arg Ile Lys Gln His			
495	500	505	510
Met Ile Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln			
515	520	525	

Asn Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe Thr  
 530 535 540  
 Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile Arg Arg  
 545 550 555 560  
 Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile Met Ser Ala  
 565 570 575  
 Gly Ile Pro Asp Phe Tyr Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg Tyr Leu Leu Thr  
 580 585 590 595  
 Asp Pro Asp Asn Arg Val Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu His Glu Ile Leu  
 600 605 610  
 Glu Lys Ser Lys Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu Glu Ser Met Asp Asp Gly  
 615 620 625  
 Arg Ile Lys Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu Leu Ser Leu Arg Lys Gln Leu  
 630 635 640 645  
 Ala Glu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly  
 650 655 660  
 Leu Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn Lys Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys  
 665 670 675 680  
 Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr Asp  
 685 690 695  
 Val Leu Thr Gly Glu Glu Ile Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro  
 700 705 710  
 Arg Ile Leu Val Arg Met  
 715 720

【0105】配列番号：2

配列の型：核酸

配列の長さ：2160

## 配列

GTGATATCAG CAACCTACAG ATTACAGTTA AATAAGAATT TTAATTTGG TGACGTAATC 60  
 GATAACCTAT GGTATTTAA GGATTTAGGA GTTCCCAC TCTACCTCTC TCCTGTCTTA 120  
 ATGGCTTCGC CAGGAAGTAA CCATGGGTAC GATGTAATAG ATCATTCAGA GATAAACGAT 180  
 GAACTTGGAG GAGAGAAAAGA ATACAGGAGA TTAATAGAGA CAGCTCATAC TATTGGATTA 240  
 GGTATTATAC AGGACATAGT ACCAAATCAC ATGGCTGTAA ATTCTCTAAA TTGGCGACTA 300  
 ATGGATGTAT TAAAAATGGG TAAAAAGAGT AAATATTATA CGTACTTTGA CTTTTCCCA 360  
 GAAGATGATA AGATACGATT ACCCATATTA GGAGAAGATT TAGATACAGT GATAAGTAAA 420  
 GGTATTAAAGA AGATAGTAAAGA AGATGGAGAT GAATATTCC TAGAATATTT CAAATGGAAA 480  
 CTTCCCTCAA CAGAGGTTGG AAATGATATA TACGACACTT TACAAAAACA GAATTATACC 540  
 CTAATGTCTT GGAAAATCC TCCTAGCTAT AGACGATTCT TCGATGTTAA TACTTTAATA 600  
 GGAGTAAATG TCGAAAAAGA TCACGTATT CAAGAGTCCC ATTCAAAGAT CTTAGATTAA 660  
 GATGTTGATG GCTATAGAAT TGATCATATT GATGGATTAT ATGATCCTGA GAAATATATT 720  
 AATGACCTGA GGTCAATAAT TAAAAATAAA ATAATTATTG TAGAAAAAT TCTGGGATT 780  
 CAGGAGGAAT TAAAATTAAA TTCAGATGGA ACTACAGGAT ATGACTTCTT AAATTACTCC 840  
 AACTTACTGT TTAATTTAA TCAAGAGATA ATGGACAGTA TATATGAGAA TTTCACAGCG 900  
 GAGAAAATAT CTATAAGTGA AAGTATAAAG AAAATAAAAG CGCAAATAAT TGATGAGCTA 960  
 TTTAGTTATG AAGTTAAAG ATTAGCATCA CAACTAGGAA TTAGCTACGA TATATTGAGA 1020  
 GATTACCTT CTGTATAGA TGTGTACAGA ACTTATGCTA ATCAGATTGT AAAAGACTGT 1080  
 GATAAGACCA ATGAGATAGA GGAAGCAACC AAAAGAAATC CAGAGGCTTA TACTAAATTA 1140  
 CAACAATATA TGCCAGCACT ATACGCTAA GCTTATGAAG ATACTTTCTT CTTTAGATAC 1200  
 AATAGATTAA TATCCATAAA TGAGGTTGGA AGCGATTAC GATATTATAA GATATCGCCT 1260  
 GATCACTTTC ATGTTAA TCAAAACGAGA AGAGGAAAAA TCACACTAAA TGCCACTAGC 1320  
 ACACATGATA CTAAGTTAG TGAAGATGTA AGGATGAAAA TAAGTGTATT AAGTGAATT 1380

33

34

CCTGAAGAAT GGAAAATAA GGTGAGGAA TGGCATAGTA TCATAAATCC AAAGGTATCA 1440  
 AGAAAATGATG AATATAGATA TTATCAGGTT TTAGTGGAA GTTTTATGA GGGATTCTCT 1500  
 AATGATTTA AGGAGAGAAT AAAGCAACAT ATGATAAAAA GTGTCAGAGA AGCTAAGATA 1560  
 AATACTCAT GGAGAAATCA AAATAAAGAA TATGAAAATA GAGTAATGGA ATTAGTCGAA 1620  
 GAAACTTTA CCAATAAGGA TTTCATTAAA AGTTCATGA AATTGAAAG TAAGATAAGA 1680  
 AGGATAGGCA TGATTAAGAG CTTATCCTTG GTCGCATTAA AAATTATGTC AGCCGGTATA 1740  
 CCTGATTTT ATCAGGGAAC AGAAATATGG CGATATTAC TTACAGATCC AGATAACAGA 1800  
 GTCCCAGTGG ATTTAAGAA ATTACACGAA ATATTAGAAA AATCCAAAAA ATTTGAAAAA 1860  
 AATATGTTAG AGTCTATGGA CGATGGAAGA ATTAAGATGT ATTTAACATA TAAGCTTTA 1920  
 TCCCTAAGAA AACAGTTGCC TGAGGATT TTAAAGGGCG AGTATAAGGG ATTAGATCTA 1980  
 GAAGAAGGAC TATGTGGTT TATTAGTTT AACAAAATT TGGTAATAAT AAAAACCAAG 2040  
 GGAAGTGTAA ATTACAAACT GAAACTGAA GAGGGAGCAA TTTACACAGA TGTATTGACA 2100  
 GGAGAAGAAA TAAAGAAGA GGTACAGATT AATGAGCTAC CTAGGATACT AGTTAGAATG 2160

【0106】配列番号：3

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：30

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメントの種類：N末端フラグメント

配列

Met	Ile	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Asn	Phe
1															15
Gly	Asp	Val	Ile	Asp	Asn	Leu	Trp	Tyr	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly		
														20	30

【0107】配列番号：4

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：11

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Val	Glu	Glu	Trp	His	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Lys
1										
										10

【0108】配列番号：5

配列の種類：Genomic DNA

配列の長さ：2160

配列の特徴

配列の型：核酸

30 起源

鎖の数：二本鎖

生物名：スルフォルブス・アシドカルダリウス

トポロジー：直鎖状

株名：ATCC33909

配列

GTG	ATA	TCA	GCA	ACC	TAC	AGA	TTA	CAG	TTA	AAT	AAG	AAT	TTT	AAT	TTT	48
Met	Ile	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Asn	Phe	
1															15	
GGT	GAC	GTA	ATC	GAT	AAC	CTA	TGG	TAT	TTT	AAG	GAT	TTA	GGA	GTT	TCC	96
Gly	Asp	Val	Ile	Asp	Asn	Leu	Trp	Tyr	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Ser	
															20	
CAT	CTC	TAC	CTC	TCT	CCT	GTC	TTA	ATG	GCT	TCG	CCA	GGA	AGT	AAC	CAT	144
His	Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	Val	Leu	Met	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Asn	His	
															35	
GGG	TAC	GAT	GTA	ATA	GAT	CAT	TCA	AGG	ATA	AAC	GAT	GAA	CTT	GGA	GGA	192
Gly	Tyr	Asp	Val	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Ile	Asn	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	
															50	
GAG	AAA	GAA	TAC	AGG	AGA	TTA	ATA	GAG	ACA	GCT	CAT	ACT	ATT	GGA	TTA	240
Glu	Lys	Glu	Tyr	Arg	Arg	Leu	Ile	Glu	Thr	Ala	His	Thr	Ile	Gly	Leu	
															65	
GGT	ATT	ATA	CAG	GAC	ATA	GTA	CCA	AAT	CAC	ATG	GCT	GTA	AAT	TCT	CTA	288
Gly	Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Val	Pro	Asn	His	Met	Ala	Val	Asn	Ser	Leu	

85	90	95
AAT TGG CGA CTA ATG GAT GTA TTA AAA ATG GGT AAA AAG AGT AAA TAT	336	
Asn Trp Arg Leu Met Asp Val Leu Lys Met Gly Lys Ser Lys Tyr		
100	105	110
TAT ACG TAC TTT GAC TTT TTC CCA GAA GAT GAT AAG ATA CGA TTA CCC	384	
Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Pro Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu Pro		
115	120	125
ATA TTA GGA GAA GAT TTA GAT ACA GTG ATA AGT AAA GGT TTA TTA AAG	432	
Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu Lys		
130	135	140
ATA GTA AAA GAT GGA GAT GAA TAT TTC CTA GAA TAT TTC AAA TGG AAA	480	
Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Trp Lys		
145	150	155
CTT CCT CTA ACA GAG GTT GGA AAT GAT ATA TAC GAC ACT TTA CAA AAA	528	
Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn Asp Ile Tyr Asp Thr Leu Gln Lys		
165	170	175
CAG AAT TAT ACC CTA ATG TCT TGG AAA AAT CCT CCT AGC TAT AGA CGA	576	
Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp Lys Asn Pro Pro Ser Tyr Arg Arg		
180	185	190
TTC TTC GAT GTT AAT ACT TTA ATA GGA GTA AAT GTC GAA AAA GAT CAC	624	
Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile Gly Val Asn Val Glu Lys Asp His		
195	200	205
GTA TTT CAA GAG TCC CAT TCA AAG ATC TTA GAT TTA GAT GTT GAT GGC	672	
Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys Ile Leu Asp Leu Asp Val Asp Gly		
210	215	220
TAT AGA ATT GAT CAT ATT GAT GGA TTA TAT GAT CCT GAG AAA TAT ATT	720	
Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Lys Tyr Ile		
225	230	235
AAT GAC CTG AGG TCA ATA ATT AAA AAT AAA ATA ATT ATT GTA GAA AAA	768	
Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu Lys		
245	250	255
ATT CTG GGA TTT CAG GAG GAA TTA AAA TTA AAT TCA GAT GGA ACT ACA	816	
Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr Thr		
260	265	270
GGA TAT GAC TTC TTA AAT TAC TCC AAC TTA CTG TTT AAT TTT AAT CAA	864	
Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn Gln		
275	280	285
GAG ATA ATG GAC AGT ATA TAT GAG AAT TTC ACA GCG GAG AAA ATA TCT	912	
Glu Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile Ser		
290	295	300
ATA AGT GAA AGT ATA AAG AAA ATA AAA GCG CAA ATA ATT GAT GAG CTA	960	
Ile Ser Glu Ser Ile Lys Lys Ile Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu Leu		
305	310	315
TTT AGT TAT GAA GTT AAA AGA TTA GCA TCA CAA CTA GGA ATT AGC TAC	1008	
Phe Ser Tyr Glu Val Lys Arg Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ile Ser Tyr		
325	330	335
GAT ATA TTG AGA GAT TAC CTT TCT TGT ATA GAT GTG TAC AGA ACT TAT	1056	
Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Leu Ser Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr Tyr		
340	345	350
GCT AAT CAG ATT GTA AAA GAG TGT GAT AAG ACC AAT GAG ATA GAG GAA	1104	

Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu Glu  
 355                   360                   365  
 GCA ACC AAA AGA AAT CCA GAG GCT TAT ACT AAA TTA CAA CAA TAT ATG 1152  
 Ala Thr Lys Arg Asn Pro Glu Ala Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr Met  
 370                   375                   380  
 CCA GCA GTA TAC GCT AAA GCT TAT GAA GAT ACT TTC CTC TTT AGA TAC 1200  
 Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala Tyr Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg Tyr  
 385                   390                   395                   400  
 AAT AGA TTA ATA TCC ATA AAT GAG GTT GGA AGC GAT TTA CGA TAT TAT 1248  
 Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr Tyr  
 405                   410                   415  
 AAG ATA TCG CCT GAT CAG TTT CAT GTA TTT AAT CAA AAA CGA AGA GGA 1296  
 Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val Phe Asn Gln Lys Arg Arg Gly  
 420                   425                   430  
 AAA ATC ACA CTA AAT GCC ACT AGC ACA CAT GAT ACT AAG TTT AGT GAA 1344  
 Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr His Asp Thr Lys Phe Ser Glu  
 435                   440                   445  
 GAT GTA AGG ATG AAA ATA AGT GTA TTA AGT GAA TTT CCT GAA GAA TGG 1392  
 Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu Trp  
 450                   455                   460  
 AAA AAT AAG GTC GAG GAA TGG CAT AGT ATC ATA AAT CCA AAG GTC TCA 1440  
 Lys Asn Lys Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn Pro Lys Val Ser  
 465                   470                   475                   480  
 AGA AAT GAT GAA TAT AGA TAT TAT CAG GTT TTA GTG GGA AGT TTT TAT 1488  
 Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr Gln Val Leu Val Gly Ser Phe Tyr  
 485                   490                   495  
 GAG GGA TTC TCT AAT GAT TTT AAG GAG AGA ATA AAG CAA CAT ATG ATA 1536  
 Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys Glu Arg Ile Lys Gln His Met Ile  
 500                   505                   510  
 AAA AGT GTC AGA GAA GCT AAG ATA AAT ACC TCA TGG AGA AAT CAA AAT 1584  
 Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln Asn  
 515                   520                   525  
 AAA GAA TAT GAA AAT AGA GTA ATG GAA TTA GTG GAA GAA ACT TTT ACC 1632  
 Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe Thr  
 530                   535                   540  
 AAT AAG GAT TTC ATT AAA AGT TTC ATG AAA TTT GAA AGT AAG ATA AGA 1680  
 Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile Arg  
 545                   550                   555                   560  
 AGG ATA GGG ATG ATT AAG AGC TTA TCC TTG GTC GCA TTA AAA ATT ATG 1728  
 Arg Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile Met  
 565                   570                   575  
 TCA GCC GGT ATA CCT GAT TTT TAT CAG GGA ACA GAA ATA TGG CGA TAT 1776  
 Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Tyr Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg Tyr  
 580                   585                   590  
 TTA CTT ACA GAT CCA GAT AAC AGA GTC CCA GTG GAT TTT AAG AAA TTA 1824  
 Leu Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Val Pro Val Asp Phe Lys Leu  
 595                   600                   605  
 CAC GAA ATA TTA GAA AAA TCC AAA AAA TTT GAA AAA AAT ATG TTA GAG 1872  
 His Glu Ile Leu Glu Lys Ser Lys Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu Glu  
 610                   615                   620

TCT ATG GAC GAT GGA AGA ATT AAG ATG TAT TTA ACA TAT AAG CTT TTA 1920  
 Ser Met Asp Asp Gly Arg Ile Lys Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu Leu  
 625 630 635 640  
 TCC CTA AGA AAA CAG TTG GCT GAG GAT TTT TTA AAG GGC GAG TAT AAG 1968  
 Ser Leu Arg Lys Gln Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr Lys  
 645 650 655  
 GGA TTA GAT CTA GAA GAA GGA CTA TGT GGG TTT ATT AGG TTT AAC AAA 2016  
 Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn Lys  
 660 665 670  
 ATT TTG GTA ATA ATA AAA ACC AAG GGA AGT GTT AAT TAC AAA CTG AAA 2064  
 Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu Lys  
 675 680 685  
 CTT GAA GAG GGA GCA ATT TAC ACA GAT GTA TTG ACA GGA GAA GAA ATT 2112  
 Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr Asp Val Leu Thr Gly Glu Glu Ile  
 690 695 700  
 AAA AAA GAG GTA CAG ATT AAT GAG CTA CCT AGG ATA CTA GTT AGA ATG 2160  
 Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Arg Met  
 705 710 715 720

## 【図面の簡単な説明】

【図1】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が產生する耐熱性酵素の至適温度を示す図である。

【図2】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が產生する耐熱性酵素の至適 pH を示す図である。

【図3】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が產生する耐熱性酵素の熱安定性を示す

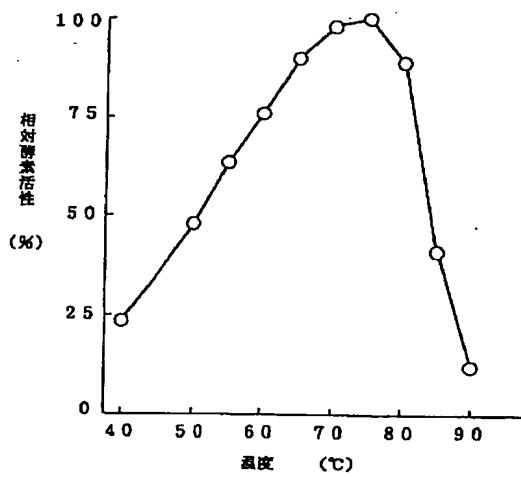
図である。

【図4】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が產生する耐熱性酵素の pH 安定性を示す図である。

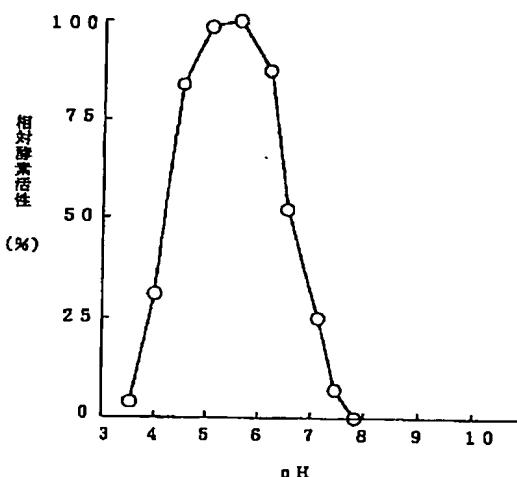
【図5】この発明による組換えDNAである p ST 3 5 の制限酵素地図である。

【図6】この発明による組換えDNAである p ST 3 6 の制限酵素地図である。

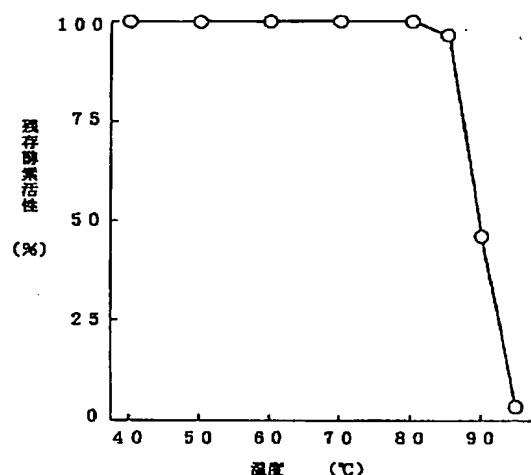
【図1】



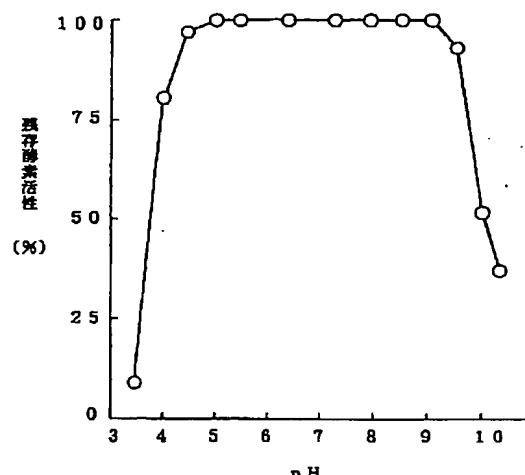
【図2】



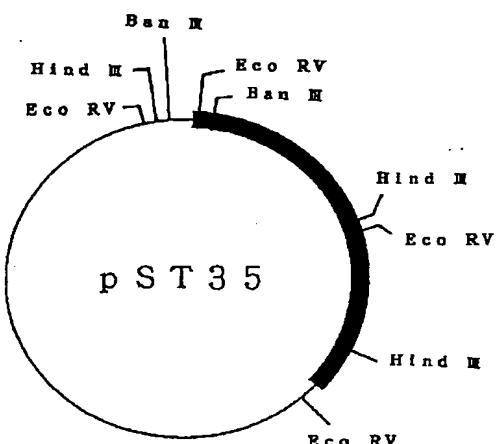
【図3】



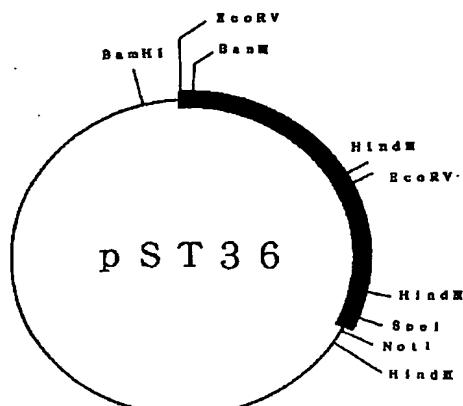
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
15/09  
C12P 19/14  
//(C12N 9/24  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )  
(C12N 15/09  
C12R 1:01 )

識別記号 ZNA  
Z 7432-4B  
9281-4B

F I

C12N 15/00  
(C12N 15/00  
C12R 1:01 )

技術表示箇所

ZNA A  
ZNA A